云 南 植 物 研 究 3(3): 359—366, 1981
Acta Botanica Yunnanica

松树某些外生菌根真菌对防治油松幼苗猝倒病的作用*

郭秀珍 谭 菲

(中国林业科学院林业研究所)

提 要

从油松根部分离到的外生菌根真菌：牛肝菌之一种（*Boletus* sp.）和厚环粘盖牛肝菌（*Suillus grevillei*）除对油松（*Pinus tabulaeformis*）幼苗猝倒病有防治作用外，还能促进幼苗生长，其显著性水平P＝0.01。引起油松幼苗猝倒病的病原菌主要是立枯丝核菌（*Rhizoctonia solani*）和尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum*）。在盆栽接种试验中，用牛肝菌和厚环粘盖牛肝菌接种，油松幼苗发病率比对照降低21.0—36%；在田间接种试验中，松苗发病率比对照降低16.3—25.8%。用扫描电镜对接了种的油松幼苗进行观察，发现在油松营养根表面形成密集的菌丝套，而根尖则没有。用石腊切片观察到围绕在菌根皮层细胞周围的哈蒂氏网。采用500毫升的广口瓶，盛入草炭150克、细砂50克、玉米粉9克、红糖1克、麦芽汁（1.03波美）300毫升的配方，接种牛肝菌菌丝体，置30℃，10天左右产生出蘑菇子实体。

近年来，国外报道了有关外生菌根可增加根的吸收面积，促进营养的积累，具有固氮能力和提高磷的营养作用。Zak B. 1964[1]报道，外生菌根除对植物有着共生的营养作用外，还可能保护纤弱的、尚没有木质化的营养根，免受病原菌的侵染。随之Sašek V. 1967[2]；Hyppel A. 1968$_a$，1968$_b$[3]，Marx D. H. 1972[4]以及Claude Richard, J. Fortin J. A. et Fortin A. 1971[5]等人又在外生菌根防治植物营养根病害、抵抗病原菌侵染的机制、菌根真菌产生抗生素等方面进行了大量的调查研究。

猝倒病是松苗主要病害之一。以往采用化学药剂防治曾取得良好效果，但土壤污染问题日益引起人们重视。松属幼苗根上通常都有外生菌根，因此，寻找某些既能促进油松幼苗生长，又具有拮抗作用能防治幼苗猝倒病的外生菌根真菌，制成“菌片”、“压缩营养饼”或“菌剂”等不同类型产品以备播种时采用，这在经济上和实践上对松属育苗都具有一定的重要意义。同时，在土壤真菌资源的利用及节约能源等方面又能开辟一条新的途径。

为此，我们在1978—1980年在试验室、温室和田间条件下进行了外生菌根防治松苗猝倒病的试验研究。

---

* 文中扫描电镜照片由中国科学院动物研究所李文浩、徐竹群同志拍摄，其它照片由中国林科院张培义、唐天民同志拍摄，一并致谢。

材 料 和 方 法

一、菌种来源

1.菌根真菌 从约30年生的油松林内采的菌根真菌蘑菇子实体，分离、培养在0.5%柠檬酸酸化麦芽汗（1.03波美）培养基上，置27°C下而得。从诸种外生菌根真菌中，我们选用了其中两个种，一种是牛肝菌属中的一个未鉴定的菌株，另一种是厚环粘盖牛肝菌。这些菌根真菌子实体基部菌丝束紧紧地生长在油松根部。

2.病原菌 直接从油松病苗及苗圃土壤中分离，在0.5%柠檬酸酸化麦芽汁（1.03波美）培养基上培养。纯化后，除用油松、马尾松、杉木等幼苗进行致病力测定外，并将主要致病菌进行鉴定。采用的病原菌为立枯丝核菌（*Rhizoctonia solani*）和尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum*）。

二、拮抗作用的测定

除采用常规的琼胶平板法测定外，并用Bain 校改 Mcardle 的液体培养基，置27°C，振荡培养7—10天，离心（4000转/分）半小时，过滤，取上清液测定。

三、接种体的繁殖

将牛肝菌和厚环粘盖牛肝菌分别培养在每500毫升的广口瓶内含有草炭150克、细砂50克、玉米粉9克、红糖1克、麦芽汁（1.03波美）300毫升的混合培养基内。置30°C下，为期不超过10天，此时菌丝生长茂盛，还没有形成小蘑菇子实体。如一旦形成子实体，菌丝则显出老化。

四、接种试验

1.盆栽接种 采用75×50×20厘米的木箱，每个木箱内除盛入定量的未消毒的苗圃土壤外，并接种一瓶上述500毫升广口瓶繁殖好的接种体。同时用未消毒的油松松林土和未接种的苗圃土做为对照。每木箱播种三行。各处理重复两个。

2.田间接种 采用高垅播种，每条垅长6米，垅背宽50厘米，每垅播种两行。播种时每行接种一瓶上述500毫升广口瓶培养好的接种体。每处理重复两垅。

五、油松种子处理和苗木调查

种子经挑选后，用45°C温水浸种、催芽，按定量撒入木箱或田间播种沟内。自播种后开始直到幼苗停止发病的一个半月中，每周调查幼苗发病率、病原菌种类组成、病害消长规律及幼苗生长情况等。

六、扫描电镜观察

先将样品分别固定、脱水，用醋酸异戊脂处理后，进行临界点干燥。再经高真空镀膜喷金，即可采用扫描电镜观察，并在100—5000放大倍率下摄影。

试 验 结 果

一、不同季节油松幼苗猝倒病病原菌种类组成

1979—80年分别对自然感病条件下的油松病苗进行系统分离。结果表明，春播油

松5月上旬开始出土。在松苗不断出土期间，即5月中、下旬到5月底，引起种芽腐烂和幼苗猝倒的病原菌主要是丝核菌（图1），5月下旬左右，镰刀菌逐渐增多。交链孢菌始终比前两者数量要少。随土温上升和幼苗发育阶段不同，致病菌的组成及数量也有明显变化，而且后期经常出现混合感染。

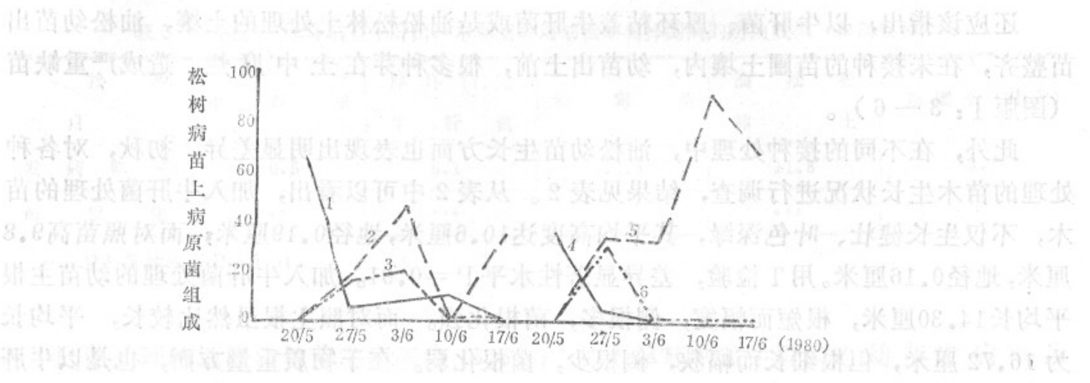


图1　不同季节油松幼苗猝倒病病原菌组成

1.丝核菌；　2.镰刀菌；　3.交链孢菌；　4.丝核菌＋镰刀菌；
5.镰刀菌＋交链孢菌；　6.丝核菌＋交链孢菌。

二、菌根真菌培养基的选择

将牛肝菌和厚环粘盖牛肝菌子实体经表面消毒后，分别在马铃薯、葡萄糖、洋菜培养基，沃氏菌根培养基及0.5%柠檬酸酸化麦芽汁（1.03波美）洋菜培养基等九种不同的培养基上，置27°C培养。结果表明，以酸化麦芽汁洋菜培养基生长最好，不仅获得纯菌株，而且生长迅速。

三、拮抗作用测定

采用琼胶平板法测定拮抗作用（见图版Ⅰ：1—2）表明，牛肝菌和厚环粘盖牛肝菌对立枯丝核菌和尖孢镰刀菌都有一定的抑制作用。但采用它们的培养过滤液测定时，该两种菌根真菌对上述两种致病菌均未表现出有抑制作用。

四、接种试验

1.盆栽接种　将培养了约10天的外生菌根真菌（牛肝菌和厚环粘盖牛肝菌）以及病原菌（立枯丝核菌和尖孢镰刀菌），单独或混合接种到盛有未消毒的苗圃土壤的木箱中。同时用未接种的苗圃土作对照。自幼苗开始发病到停止发病的一个半月期间内，每周调查幼苗发病率，累计结果如表1所示。用牛肝菌单独接种时，松苗猝倒病的发病率为

表1　牛肝菌、厚环粘盖牛肝菌对油松幼苗猝倒病的防治效果（盆栽接种）

项　目	立枯丝核菌	尖孢镰刀菌	牛肝菌	厚环粘盖牛肝菌	牛肝菌＋立枯丝核菌	牛肝菌＋尖孢镰刀菌	油松林松林土	苗圃土（对照）
发病率%	76.0	83.3	52.8	60.0	60.6	66.6	37.8	73.8

52.8%，用厚环粘盖牛肝菌单独接种时，为60.0%。将油松种子直接播种到油松松林土内时，松苗的发病率最低，仅为37.8%，这是因为松林土内，各种真菌的菌丝都很丰富，特别是外生菌根真菌更是缠结紧密，这对病原菌起到了抑制作用。此外，松林土土壤疏松，对油松出土有利。不加任何处理的苗圃土壤内，发病率高达73.7%。总之，经过不同菌根真菌接种体处理的土壤上，油松幼苗发病率比对照降低21.0—36.0%。（表1）

还应该指出，以牛肝菌、厚环粘盖牛肝菌或是油松松林土处理的土壤，油松幼苗出苗整齐，在未接种的苗圃土壤内，幼苗出土前，很多种芽在土中腐烂，造成严重缺苗（图版Ⅰ：3—6）。

此外，在不同的接种处理中，油松幼苗生长方面也表现出明显差异。初秋，对各种处理的苗木生长状况进行调查，结果见表2。从表2中可以看出，加入牛肝菌处理的苗木，不仅生长健壮、叶色深绿，其平均高度达10.6厘米，地径0.19厘米；而对照苗高9.8厘米，地径0.16厘米。用T检验，差异显著性水平P＝0.01。加入牛肝菌处理的幼苗主根平均长14.30厘米，根短而幅宽，侧根多，菌根化强。而对照主根虽然比较长，平均长为16.72厘米，但根细长而幅狭，侧根少，菌根化弱。在干物质重量方面，也是以牛肝菌处理的为重。（表2）

表2 牛肝菌对油松幼苗生长的影响（盆栽接种）

调查幼苗数	接种体	项目	地上部份（厘米）		地下部份（厘米）		鲜、干物质重（克）	
			苗高*	地径*	主根长	菌根化	平均鲜重	平均干重
63	牛肝菌	最大	13.1	0.21	21.0	+++	0.51	0.26
		最小	7.0	0.10	9.0			
		平均	10.6	0.19	14.3			
67	对照	最大	12.5	0.21	27.0	+	0.45	0.23
		最小	7.8	0.10	11.0			
		平均	9.8	0.16	16.7			

* 差异显著性水平P＝0.01

试验中明显看到，采用牛肝菌接种的油松幼苗根部形成丰富的二分叉菌根（图版Ⅰ：7—8），对照未加处理，幼苗根上很少形成菌根或根本没有形成菌根。将接种形成的菌根与对照的根尖经扫描电镜观察（图2：1—2），明显看出，用外生菌根接种的处理中松苗营养根表面形成密集的菌丝网，也就是菌丝套。而没有形成菌根的油松根尖部分则没有上述特征。在生物光学显微镜下对菌根的石腊切片进行观察（图2：3—4），可见到围绕在皮层细胞周围的真菌菌丝，也就是哈蒂氏网及游离的菌丝。

初秋，应用林研所土壤室所采用的养分速测法对不同处理的松苗进行营养元素测定。初步结果表明，施加牛肝菌处理的苗木，无论是叶部或是茎、根部，氮、磷、钾、铁、可溶性总糖含量等均比对照为高，尤其茎、根部表现更为突出，其不同营养元素的

含量比对照可多0.5—4倍左右。

2.田间接种　将温室盆栽接种所用的牛肝菌、厚环粘盖牛肝菌及有拮抗作用的木霉菌（*Trichoderma harzianum*）定量的撒入播种沟内，上复苗圃土。幼苗出土后每星期调查一次病苗并拔除，直到6月下旬病害停止发生为止。试验结果（表3）表明，加

表3　牛肝菌、厚环粘盖牛肝菌、木霉菌等对油松幼苗猝倒病的防治效果（田间接种）

项目＼接种	牛肝菌	厚环粘盖牛肝菌	木霉菌	油松松林土	苗圃土（对照）
发病率%	16.5	8.1	16.8	11.8	33.1
菌根化	+++	+++	+	+++	+

*差异显著性水平P＝0.01

入牛肝菌处理的地段，幼苗发病率为16.5%；加入厚环粘盖牛肝菌的幼苗发病率为8.1%；加入木霉菌的发病率为16.8%；播种沟内撒入一层油松林松林土并用该土复盖种子时，其发病率为11.6%；作为对照未加任何处理的地段，幼苗发病率为33.1%。调查中也明显看出，对照地段上很多种芽在土内腐烂，与盆栽接种情况相同（图版Ⅰ：9），出苗率低，造成严重断垅（图版Ⅰ：10之ABCD）。经牛肝菌、厚环粘盖牛肝菌和松林土处理的地段，种芽腐烂少，幼苗出土整齐、健壮，叶色深绿。

根据田间接种试验进一步看出，上述几种接种体对减少种芽在土壤内腐烂起到良好效果，促进幼苗出土整齐，保证幼苗初期出土数量。

五、牛肝菌的人工扩大繁殖

菌根真菌大量繁殖需要适当的基质和条件。根据对上述两种菌根真菌的生物学和生理特性的研究，我们配制了不同的配方繁殖牛肝菌及厚环粘盖牛肝菌。其中有一种配方的基质和培养方法，对牛肝菌的人工繁殖比较有利。用500毫升的广口瓶，盛入草炭150克、细砂50克、玉米粉9克、红糖1克、麦芽汁（1.03波美）300毫升的配方，在27°—30°C条件下，接种10天左右就产生很多小蘑菇子实体（图2：5）。如配方不恰当，或条件不适，虽长菌丝但不形成子实体或仅形成厚的菌丝膜。

问题和讨论

1.在拮抗作用测定中，牛肝菌和厚环粘盖牛肝菌在琼胶平板培养基上对立枯丝核菌和尖孢镰刀菌具有较强的拮抗作用，而用其培养过滤液测定时，均未形成抑制圈，几乎没有抗真菌作用。前者的抑制作用是否可认为是一种重寄生或是机械的屏障作用。对于上述拮抗机制问题，还待进一步探讨。

2.在菌根真菌接种体施入土内时，同时也带入了一定的培养基，这样就加强了土壤中微生物之间的相互竞争和相互拮抗作用。因此，对各种处理的土壤微生物区系的动态应进一步研究。

含量比对照可达[illegible]

[illegible]的牛肝菌、厚环粘盖牛肝菌及有拮抗作用的木霉菌（Trichoderma [illegible]）[illegible]，对苗出土后猝倒[illegible]（表3）表明，加

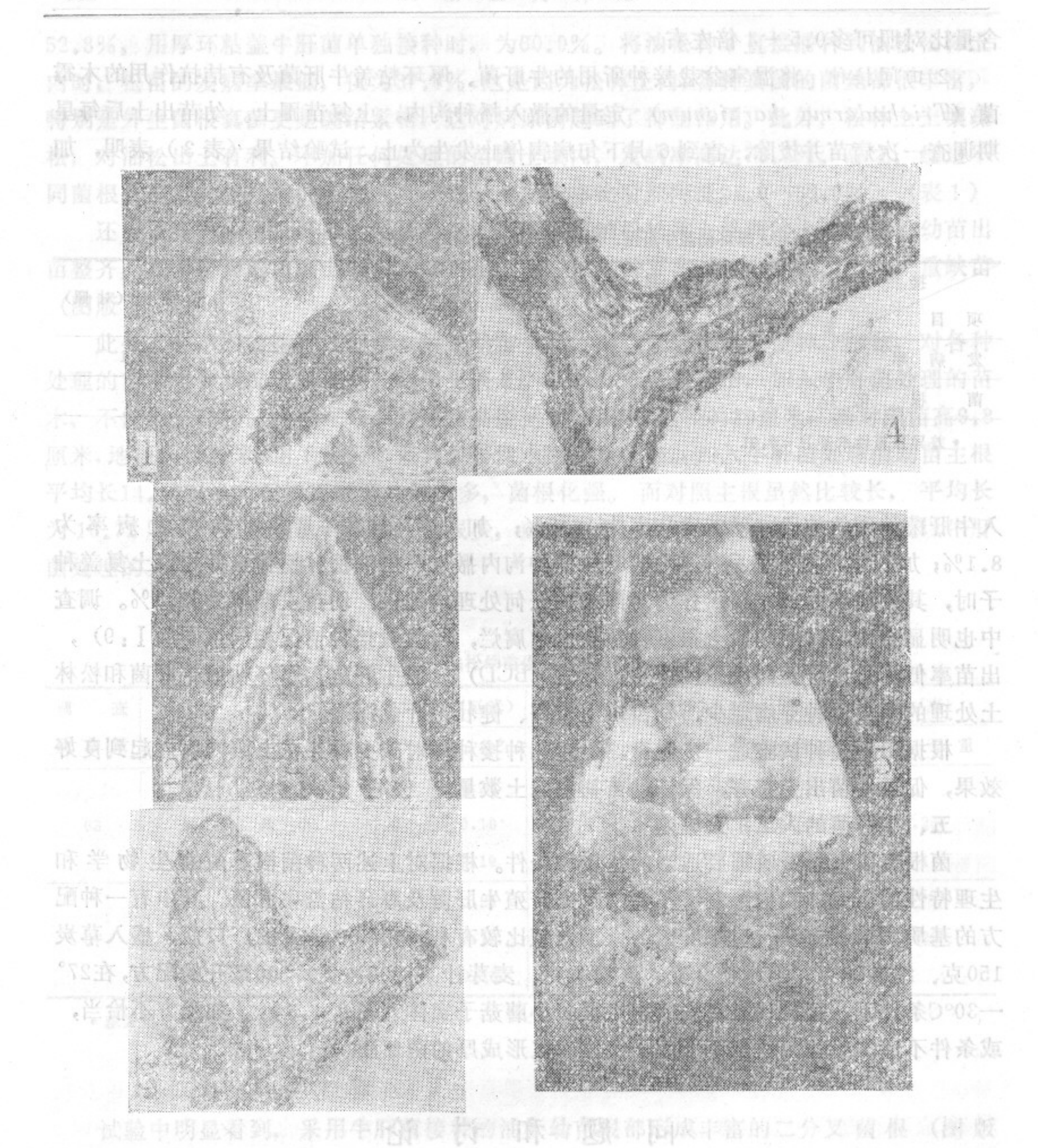


图2　1.一年生油松的菌根菌丝套（扫描电镜160×）；2.一年生油松根尖（扫描电镜160×）；3—4.一年生油松菌根纵切面（32×）；5.牛肝菌之一种（*Boletus* sp.）在广口瓶内扩大生长的情况（培养10天）。

[illegible]上对立枯丝核菌[illegible]从[illegible]乎没有抗真菌作用，前者的抑制作用是否可认为是一种重寄生或是机械的屏障作用，对于上述拮抗机制问题，还待进一步探讨。

2.在菌根真菌接种体施入土内时，同时也带入了一定的培养基，这样就加强了土壤中微生物之间的相互竞争和相互拮抗作用。因此，对各种处理的土壤微生物区系的动态应进一步研究。

参 考 文 献

〔1〕 Zak, B., 1964: Role of mycorrhizae in root disease. Ann. Rev. Phytopathol. 2:377—392.
〔2〕 Sasĕk, V., 1967: The protective effect of mycorrhizae fungi on the host plant. IUFRO XIVieme Congres, Section 24. pp. 182—190.
〔3〕 Hyppel, A., 1968: Antagonistic effects of soil fungi on Fomes annosus in laboratory experiments. Stud. Forest Suec., Nr 64. Skogsholgskolan, Stockholm. p. 18.
——, 1968: Effect of Fomes annosus on seedlings of Picea abies in the presence of Boletus bovinus. Stud. Forest Suec., Nr 66. Skogsholgskolan, Stockholm. p. 16.
〔4〕 Marx, D. H., 1972: Ectomycorrhizae as biological determents to pathogenic root infections. Annua Review of Phytopathology. Volume. 10. P. 429—453.
〔5〕 Claude Richard, J., Fortin, J. A. and Fortin, A., 1971: Protective Effect of an Ectomycorrhiza Fungus against the Root Pathogen Mycelium radicis atrovirens. Canadian Journal of Forest Research 1(4): 246—251.

THE PROTECTIVE EFFECT OF SEVERAL MYCORRHIZAL FUNGI——BOLETUS SP. AND SUILLUS GREVILLEI ON THE DAMPING-OFF DISEASE OF SEEDLINGS OF PINUS TABULAEFORMIS

Kuo Shiu-chien　Tang Fei

(The Research Institute of Forestry of the Chinese Academy of Forestry)

ABSTRACT

The damping-off disease is one of the most important diseases of pine seedlings in nurseries. By using some chemical fungicides we have effectively controlled this disease, but the soil pollution problem must still be considered. We have found out several ectomycorrhizae, such as *Suillus grevillei* (Kl.) Sing. and *Boletus* sp., that may not only promote the growth of pine seedlings, but also protect them from infection of damping-off disease.

Boletus sp and *Suillus grevillei* as the antagonists, were collected and isolated from the roots of pine trees (*Pinus tabulaeformis*) in a 30-year's pine forest. The *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*, as the main pathogens of the damping-off of pine seedlings, were isolated from both diseased seedlings of *Pinus tabulaeformis* and the soil suspensions obtained by

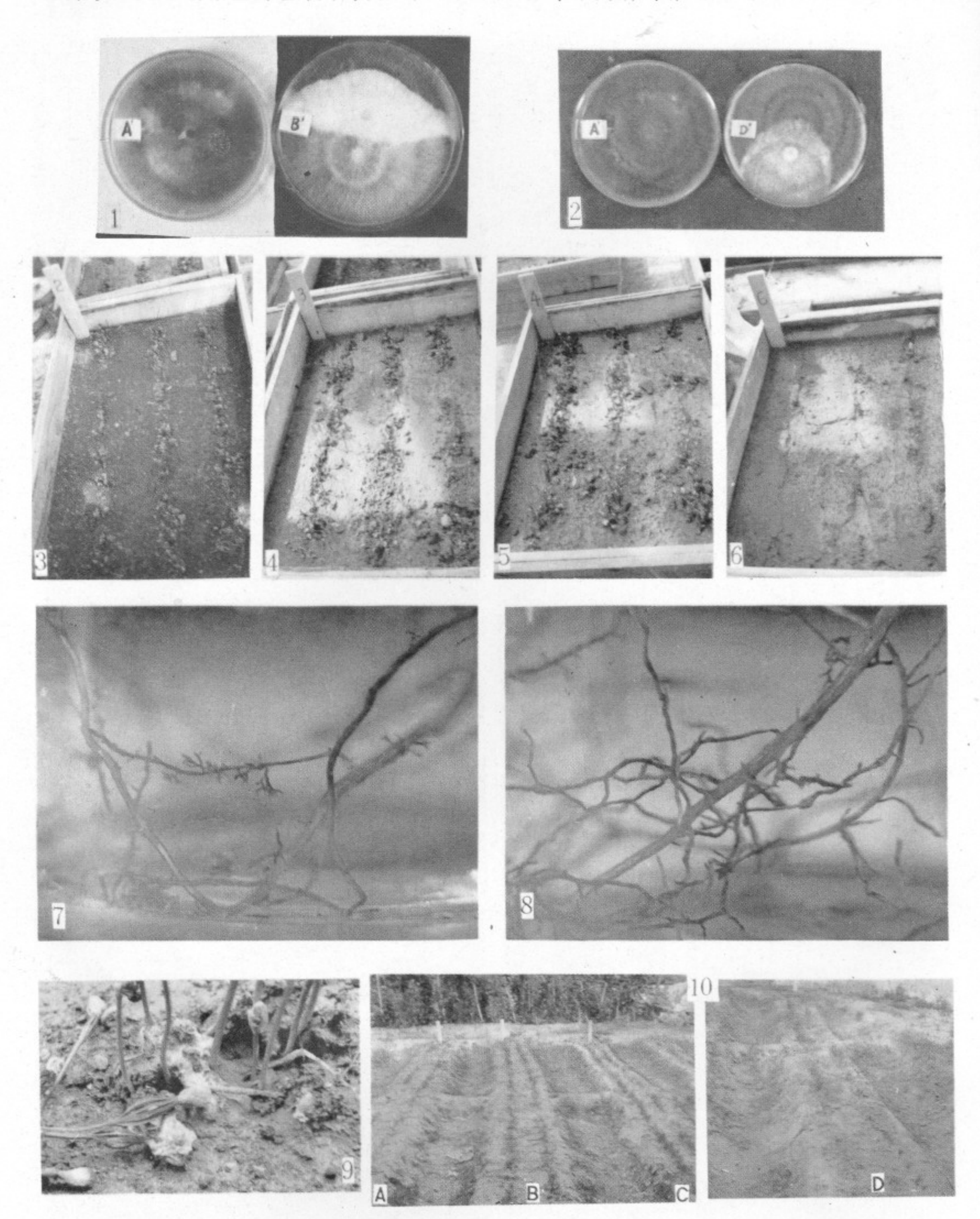
the method of soil dillution plate.

Antagonistical test on the solid plat agar medium shows that *Boletus* sp. and *Suillus grevillei* revealed strong antagonism against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*, but neither culture filtrate of these mycorrhizae showed any antagonistical action on them.

For plot inoculation experiment in $75 \times 50 \times 20$ cm wooden flat under greenhouse condition organisms were grown aseptically for about 2 weeks at 27°C in a 500 ml flask containing peat, sand, corn meal, red sugar, fresh wort (about 1.03 Baume) medium. The result shows that *Boletus* sp. and *Suillus grevillei* were highly effective in controlling preemergence and postemergence damping-off of *Pinus tabulaeformis* caused mainly by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. The mortality of pine seedlings caused by damping-off disease was decreased by 21.0—36.0% as compared with the check plot.

The field inoculation experiment result was also satisfactory. The mortality of the *Pinus tabulaeformis* seedlings caused by dampimg-off disease was also apparently decreased.

According to the biological and physiological characteristics of these mycorrhizal fungi we have made up several media under different conditions for their reproduction. The most favourable medium for its reproduction is mentioned above. In this medium after inoculation for just about 10 days there were many *Boletus's* sporocarps (mushrooms) formed.



1—2.牛肝菌和厚环粘盖牛肝菌对立枯丝核菌的拮抗作用（培养5天）：

1.A'——立枯丝核菌（Rhizoctonia solani）；　B'——牛肝菌之一种（Boletus sp.）对立枯丝核菌的抑制；

2.A'——立枯丝核菌；　D'——厚环粘盖牛肝菌（Suillus grevillei）对立枯丝核菌的抑制作用；

3.油松松林土；　4.接种牛肝菌；　5.接种厚环粘盖牛肝菌；　6.苗圃土未接种（对照）（3—6.示两种牛肝菌对油松幼苗猝倒病的防治作用）；　7.一年生油松接种牛肝菌（Boletus sp.）后形成的菌根；

8.油松根未接种菌根的对照。　9.油松种芽和幼苗在土中腐烂及猝倒；

10.牛肝菌、木霉菌、厚环粘盖牛肝菌对油松幼苗猝倒病的防治：　A.——接种牛肝菌；

B——接种木霉菌；　C——接种厚环粘盖牛肝菌；　D——对照。